



## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

**6º ANO - 2011/2012**

“Que Fisiopatologia Justifica a Utilização de Corticoesteróides no Choque séptico?”

PEDRO MORAIS DE ALMEIDA AGUIAR COELHO

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR**

**PEDRO MORAIS DE ALMEIDA AGUIAR COELHO**

Dissertação de Mestrado Integrado em  
Medicina submetida no Instituto de Ciências  
Biomédicas Abel Salazar

Orientador: Dr. Arlindo Guimas, Assistente  
Hospitalar de Medicina II no Hospital de Santo  
António

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel  
Salazar Rua de Jorge Viterbo Ferreira n.º 228,  
4050-313 PORTO

## Índice

Resumo .....	4
Abstract .....	5
Introdução .....	6
Material e métodos .....	9
Mecanismo de acção dos corticoesteróides .....	10
a) Efeitos genómicos .....	10
b) Efeitos não-genómicos .....	11
Mecanismos fisiopatológicos do choque séptico .....	13
a) Produção de Óxido Nítrico .....	14
b) Produção de Prostaciclina I2 .....	16
c) Formação de Peroxinitrito .....	16
d) Indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) .....	17
e) Activação canais de potássio dependentes de ATP (KATP) .....	18
f) Défice de Vasopressina .....	19
Alterações da coagulação .....	21
Sistema imune na sépsis .....	22
Efeitos dos corticoesteróides no sistema cardiovascular .....	25
Conclusão .....	27
Referências bibliográficas .....	28

## Resumo

O desenvolvimento da sépsis é um processo altamente complexo com alterações em vários órgãos e tecidos, em que se verifica a interação quer de componentes bacterianos quer de outros microorganismos, com receptores existentes nas células do hospedeiro que culminam na activação de vias de sinalização intracelulares, como a do NF-kB, responsáveis pela transcrição e activação de inúmeras moléculas pró-inflamatórias. Uma resposta inflamatória sistémica amplificada e desregulada é o principal mecanismo fisiopatológico associado à sépsis, responsável pelo desencadear de diversas alterações patológicas capazes de culminar em choque distributivo.

Actualmente, apesar da vasta panóplia de medidas terapêuticas existentes, o choque séptico mantém-se associado a uma taxa de mortalidade extremamente alta. Os glucocorticóides, no contexto desta patologia, são utilizados como medida de último recurso. Tendo em conta que para se conseguir tratar melhor é fundamental conhecer ao máximo a fisiopatologia por de trás da doença, assim como do fármaco em questão, o objectivo deste trabalho é descrever possíveis mecanismos fisiopatológicos do choque séptico que justifiquem a utilização de glucocorticóides nesta patologia. Assim, foi realizada uma revisão da literatura publicada até ao momento na base de dados *Medline*®, pertinente para o tema em questão.

O uso de baixas doses de glucocorticóides (<300mg/dia de hidrocortisona) está recomendado actualmente apenas nos casos de choque séptico, permitindo aumentar a sensibilidade vascular aos agentes vasopressores.

**Palavras-chave:** Corticosteróides, choque séptico, fisiopatologia sépsis, choque distributivo, NF-kB, óxido nítrico sintetase.

## Abstract

The development of sepsis is a highly complex process with changes in various organs and tissues, where the interaction between bacterial components or other microorganisms, and the receptors in host cells results in the activation of intracellular signaling pathways, such as the NF- $\kappa$ B, responsible for the transcription and activation of numerous pro-inflammatory molecules. A systemic inflammatory response amplified and deregulated is the main pathophysiological mechanism associated with sepsis, responsible for triggering the various pathological changes that can culminate in distributive shock.

At present, despite the wide range of therapeutic measures available, septic shock remains associated with an extremely high mortality rate. Glucocorticoids, in the context of this condition are used as a measure of last row resort. Bearing in mind that to get better treatment is essential to know the most of the pathophysiology behind the disease, as well as the drug in question, the aim of this paper is to describe the possible pathophysiological mechanisms of septic shock that would justify the use of glucocorticoids in this disease. Thus, we performed a review of the literature published to date in Medline ®, relevant to the topic in question.

The use of low-dose glucocorticoids (<300mg/day hydrocortisone) is currently only recommended in cases of septic shock, allowing to increase vascular sensitivity to vasopressor agents.

**Key words:** Corticosteroids, septic shock, sepsis pathophysiology, distributive shock, NF- $\kappa$ B, nitric oxide synthase.

## Introdução

Apesar da evolução verificada no tratamento da sépsis, esta continua associada a uma elevada taxa de mortalidade assim como do consumo de recursos hospitalares (1). Em Portugal, a taxa de mortalidade por sépsis severa nas unidades de cuidados intensivos é cerca de 33% (2), podendo-se inferir assim que a taxa de mortalidade por choque séptico é ainda mais elevada.

Actualmente, os glucocorticóides (GC) são fármacos amplamente utilizados no tratamento de patologias muito distintas, nomeadamente doenças inflamatórias, autoimunes, alérgias e infecciosas (3). Ao longo dos últimos anos, tem havido um debate constante acerca do seu uso como terapêutica adjuvante no tratamento dos doentes em choque séptico.

Perante uma situação de elevado stresse, como no choque séptico, a regulação neuroendócrina da função hemodinâmica, metabólica e imunológica é essencial para a sobrevivência (4). Assim, nestas situações, ocorre a activação de diversos elementos que se sobrepõem e interagem entre si - eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e eixo simpático-adrenal - promovendo o aumento da produção de diferentes metabolitos (entre eles o cortisol) com vista a restaurar a homeostasia cardiovascular e imunológica (5). Tem surgido um grande interesse na função da glândula supra-renal no doente crítico. Esta não armazena cortisol, e em situações como a sépsis a sua produção aumentada resulta da estimulação da mesma por parte da ACTH. O cortisol libertado, circula no plasma na sua maioria (90%) ligado à globina de ligação ao cortisol, que por sua vez se encontra diminuída na sépsis, aumentando assim a fracção livre de cortisol no plasma. Os testes de função adrenal anteriormente utilizados, actualmente não são mais recomendados, devido à sua interpretação ser de difícil validação, pois medem a concentração total desta hormona em vez de medirem a fracção livre de cortisol, ou seja, a fracção activa (6) e devido à grande inter-variabilidade na medição dos valores de cortisol entre as diferentes marcas comerciais disponíveis (7).

A sépsis inicia-se através de um foco de infecção presente em qualquer parte do corpo. As células epiteliais do aparelho respiratório, gastrointestinal e génito-urinário constituem uma barreira tanto física como química contra agentes invasores, que quando ultrapassada permite a sua entrada no organismo (8). As bactérias desencadeiam posteriormente eventos intracelulares sequenciais quer a nível imunológico, endotelial e neuroendócrino (9). O sistema de imunidade inata

representado por macrófagos, neutrófilos, sistema complemento e células dendríticas, constitui a primeira linha de defesa do organismo contra agentes invasores como bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos e vírus. O mecanismo de reconhecimento dos patógenos pelo sistema de imunidade inata passa pela detecção de estruturas moleculares específicas dos patógenos pelas famílias de receptores colectivamente conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRR), existentes principalmente nos macrófagos e também nos neutrófilos. Estes receptores podem ser do tipo Toll (TLR), receptores tipo Nod (NLR) e receptor do ácido retinóico indutível do gene 1 (RLR) (10). A activação destes receptores inicia uma cascata de sinalização intracelular através da activação do factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). O sistema de transcrição do NF- $\kappa$ B regula a expressão de um grande número de genes envolvidos na resposta inflamatória e imune, assim como na proliferação, diferenciação e apoptose celular, desenvolvendo-se assim a resposta imune inata através de processos de fagocitose, produção de citocinas inflamatórias e radicais livres (9). No entanto, é fundamental que paralelamente ocorra uma resposta anti-inflamatória de forma a controlar a primeira e evitar danos tecidulares graves. O sistema de imunidade inata, através da activação de células dendríticas e de outras células apresentadoras de antígenos, vai promover a activação e diferenciação dos linfócitos T e B (resposta imune adaptativa). Esta última é uma resposta mais específica e duradoura mas que também demora mais tempo a desenvolver-se – geralmente alguns dias (10).

Os mecanismos fisiopatológicos do choque séptico são múltiplos e complexos. É geralmente aceite que uma resposta inflamatória sistémica ampliada e desregulada é o principal responsável, contribuindo para a progressão da disfunção orgânica e morte (9). Um mecanismo bem estabelecido na iniciação e progressão da resposta inflamatória sistémica presente no choque séptico é a activação da via de sinalização NF- $\kappa$ B (11). Uma activação inapropriada desta via foi já implicada na patogénese da inflamação crónica, auto-imunidade e também do cancro (12).

No entanto, apesar de a teoria da resposta inflamatória sistémica exagerada ser geralmente aceite, o sucesso aquém do esperado a nível clínico ao utilizar-se terapêuticas anti-inflamatórias no tratamento da sépsis levanta dúvidas quanto ao papel desempenhado no seu desenvolvimento.

De acordo com Hotchkiss e Karl (13), os doentes em choque séptico têm uma resposta imunológica bifásica. Nas fases precoces após um evento inicial, surge uma

resposta caracterizada por um padrão pró-inflamatório. Com o decorrer do tempo dá-se uma mudança para um estado anti-inflamatório e de imunossupressão, razão pelo qual é necessário ter em atenção à fase em que a terapia anti-inflamatória é administrada.

A eficácia dos GC em doentes em choque séptico é ainda incerta apesar de várias meta-análises terem sido recentemente publicadas (14) (15). A dificuldade em prever como é que a complexa dinâmica da resposta inflamatória é modulada, parece ser um dos factores contribuintes para tal incerteza relativamente ao uso de GC nesta condição (16). Os efeitos dos GC na sépsis estão ainda relacionados com a dosagem assim como com a severidade do quadro clínico. Vários estudos demonstraram já que o uso de altas doses de GC aumenta a taxa de mortalidade (17). Em 2004, através da Surviving Sepsis Campaign, surgiram pela primeira vez *guidelines* standardizadas relativamente ao tratamento da sépsis severa e choque séptico. Estas foram posteriormente revistas em 2008 e aconselham o uso de hidrocortisona em adultos com choque séptico refractário a medidas de ressuscitação correctas e terapia vasopressora (recomendação nível 2C). Nestas condições, a dexametasona deve ser preterida caso a hidrocortisona esteja disponível (recomendação nível 2B), em doses não superiores a 300mg/dia (recomendação nível 1A) (18).

Tendo em conta que ainda existe uma grande controvérsia sobre se é ou não pertinente o uso de GC no tratamento do choque séptico, o objectivo desta dissertação é descrever os possíveis mecanismos fisiopatológicos que possam demonstrar ser benéfico a sua utilização, a qual será realizada através da revisão da evidência publicada até ao momento sobre o problema em questão.



### Material e métodos

Para a realização deste trabalho foram pesquisadas publicações escritas em Inglês ou Português, publicadas em bases de dados *online*, nomeadamente Medline®. Esta pesquisa teve por base as palavras-chave presentes no título do trabalho assim como palavras relacionadas com o tema em questão.

## Mecanismo de acção dos corticoesteróides

Os GC são hormonas endócrinas fundamentais para a homeostasia do organismo, preparando o indivíduo para o stress. Estes exercem a sua actividade através de efeitos genómicos e efeitos não genómicos.

### a) Efeitos genómicos

Os efeitos genómicos, geralmente ocorrem com o uso de baixas doses de GC e são mediados pelos receptores de glucocorticóides existentes no citoplasma das células-alvo (GR) na forma inactivada, acoplado a um complexo de proteínas denominado de proteínas do choque térmico. Quando activados, são importados para o núcleo onde se poderão combinar formando dímeros, tal associação ocorre em locais específicos do DNA, denominados elementos de resposta aos receptores glucocorticóides (GRE) (19). Por outro lado, o GR monomérico activado pode também interagir directamente com diferentes factores de transcrição.

Existem duas isoformas do receptor de glucocorticóide, nomeadamente o GR $\alpha$  (*alfa*) e o GR $\beta$  (*beta*). A isoforma *alfa* liga cortisol, DNA e outros factores de transcrição, modificando por sua vez a actividade transcripcional dos genes alvo. Já a isoforma *beta* não exerce efeito transcripcional, mas antes um efeito dominante negativo no GR $\alpha$  através da formação de heterodímeros com o GR $\alpha$  diminuindo a sua disponibilidade e por conseguinte a sua funcionalidade, sendo responsável por uma sensibilidade diminuída ao corticóide por parte das células. As citocinas inflamatórias IL-1 e factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) aumentam a expressão selectiva da isoforma  $\beta$  do GR, aumentando assim a resistência aos GC, podendo ser relevante na disfunção inflamatória (20).

Os GR exercem a sua função quer por activação de diversos genes anti-inflamatórios como a Interleucina 10 (IL-10) e inibidor do factor nuclear kappa B (ikB)- processo mediado pelos GRE's e denominado de transactivação - quer por ligação a factores de transcrição que regulam negativamente a transcrição de genes pró-inflamatórios como a inibição do NF-kB e da Proteína Activadora 1 (AP1). Tal processo denomina-se transrepressão (21). Cao et al (22) corroboram o papel dos GC na inibição do factor NF-kB e AP-1.

Os factores de transcrição NF-kB e Proteína Activadora 1 (AP-1) estão envolvidos na transcrição de múltiplos genes pró-inflamatórios que codificam inúmeras citocinas

inflamatórias (nomeadamente, IL-1, IL-6, IL8, TNF- $\alpha$ , factor estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos, entre outras), quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas e moléculas pro-inflamatórias. O factor AP-1 tem ainda um papel importante na regulação dos genes envolvidos no desenvolvimento da resposta imune adaptativa (22). Comparativamente com os efeitos não genómicos, que podem ocorrer em segundos, o tempo necessário para activar completamente a via genómica, de forma que ocorra síntese protéica na proporção que permita a ocorrência de efeitos sistémicos, demora consideravelmente mais tempo, podendo ir de horas a dias (23).

Através da utilização de um modelo *ex vivo* de inflamação sistémica, Meduri et al (24) demonstraram ocorrer uma diminuição da actividade do GR- $\alpha$  em leucócitos do sangue periférico quando estimulados pelo plasma de doentes com síndrome de angústia respiratória aguda (ARDS) causada por sépsis, e níveis persistentemente elevados de citocinas inflamatórias, estando correlacionado com um aumento da actividade do NF-kB. Pelo contrário, nos doentes com ARDS e níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias em declínio, verificou-se que a actividade do GR- $\alpha$  foi progressivamente aumentando paralelamente à diminuição da activação do NF-kB. Estes achados demonstram que a activação insuficiente do GR- $\alpha$  pelos GC tem um papel importante na perda da regulação da inflamação, e que esta activação insuficiente pode derivar do excesso de activação do NF-kB, sugerindo assim a presença, de uma certa resistência intracelular aos GC associada à inflamação, nos doentes com sépsis e ARDS.

#### **b) Efeitos não-genómicos**

Os efeitos não genómicos podem ser de três tipos, nomeadamente, não genómicos inespecíficos, não genómicos mediados pelo GR citosólico e não genómicos mediados por GR membranal (3).

Os efeitos não genómicos mediados pelo GR ocorrem quando se estabelece a ligação GC-GR. O complexo multiprotéico associado ao receptor (composto por proteínas de choque térmico e diversas quinases da via de sinalização MAPK) dissocia-se do receptor, exercendo o seu efeito por mecanismos ainda por clarificar. Um efeito passível de ser atribuído a esta via é a libertação de lipocortina 1 e inibição da libertação de ácido araquidónico. A inibição deste último que diminui por sua vez a produção da prostaglandina H<sub>2</sub>, um produto da conversão do ácido araquidónico pela acção das enzimas ciclooxigenases, e precursor de vários mediadores biologicamente

activos e pró-inflamatórios como por exemplo a prostaciclina (acção vasodilatadora) e o tromboxano A2 (estimulador da activação plaquetária), entre outros (25).

Relativamente aos efeitos não genómicos inespecíficos, estes ocorrem por interacção directa com as membranas quer plasmáticas quer mitocondriais, alterando as suas características físico-químicas assim como das proteínas associadas às membranas. Este mecanismo parece estar associado apenas a altas doses de GC. Estas alterações resultam numa diminuição do transporte através dos canais de cálcio e sódio transmembranares das células imunes, o que se pensa estar relacionado com uma diminuição da resposta imune assim como da resposta inflamatória. Um outro mecanismo conduz a uma produção inadequada de ATP por parte das células imunes, devido a um aumento da perda de protões através da membrana mitocondrial (26).

Por fim, os efeitos não genómicos mediados por um receptor membranar de glucocorticóides (mGR), identificado em células mononucleares no sangue periférico. Este tipo de receptor parece aumentado nos monócitos em caso de estimulação por lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), sugerindo que a imunoestimulação é responsável por um aumento da expressão dos mGR, o que pode ter um impacto importante nas fases precoces do quadro séptico (3). Este mecanismo parece contribuir, para além dos efeitos genómicos, no processo de apoptose celular. Razão pelo qual são utilizados na indução da apoptose de linfócitos como parte da terapêutica de doentes com leucemia (23). Através de efeitos não genómicos mediados por mGR, ocorre uma diminuição da actividade das quinases Lck/Fyn, reduzindo a activação das diversas vias de sinalização das células T. As quinases Lck e Fyn, membros da família de tirosina quinases Src, são expressas nas células T e apresentam um importante papel na transdução de sinais mediados pelos receptores das células T que em última instância irão culminar na activação de diversas vias de sinalização como as MAPK, proteína quinase B e proteína quinase C, essenciais à activação de células T (27).

### **Mecanismos fisiopatológicos do choque séptico**

Sépsis é caracterizada pela resposta inflamatória sistémica (SIRS) desencadeada por uma infecção comprovada ou suspeitada. No entanto, a SIRS pode-se desenvolver em doentes sem presença de infecção, nomeadamente nos casos de trauma, queimaduras, pancreatite, peritonite química, entre outras (28).

As manifestações clínicas mais importantes de sépsis, nomeadamente o choque, a coagulopatia e a disfunção multiorgânica são causadas não directamente pelos patogénios invasores mas principalmente pela resposta imune inata desregulada do hospedeiro (29).

A presença de choque, resulta principalmente na falência multiorgânica causada por hipóxia, citotoxicidade, disfunção mitocondrial (30). O choque séptico, definido como hipotensão persistente induzida por sépsis apesar das medidas correctas de ressuscitação, é a causa mais comum de choque distributivo. Este tipo de choque, caracteriza-se por hipovolémia, vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar e disfunção cardíaca. Os mecanismos de choque séptico descritos na literatura são: activação dos canais de potássio dependentes de trifosfato de adenosina (KATP) das membranas plasmáticas das células de músculo liso vascular (VSMCs); produção de óxido nítrico (NO); défice de hormona vasopressina (31); produção aumentada de prostaciclina; produção aumentada de peróxinitrito e indução da enzima indolamina 2,3-dioxigenase. Todos estes mecanismos interagem entre si e resultam no final numa diminuição da concentração intracelular de cálcio nas VSMCs (32).

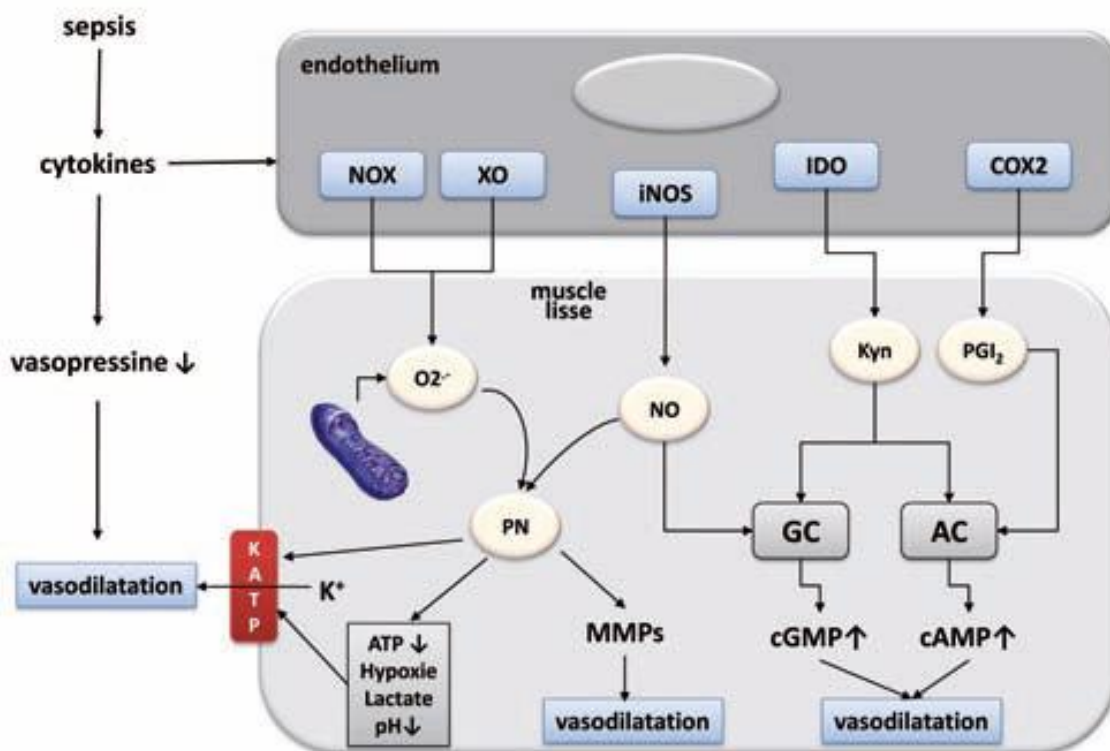


Ilustração 1: “Mecanismos fisiopatológicos do choque séptico”. Com autorização dos autores (32)

### a) Produção de Óxido Nítrico

O endotélio desempenha um papel central na microcirculação, nomeadamente na prevenção da trombose microvascular, fibrinólise, adesão leucocitária, tónus microvascular e fluxo sanguíneo. Em circunstâncias normais o fluxo sanguíneo é em parte regulado pela produção, a partir do endotélio, de agentes vasodilatadores principalmente óxido nítrico, assim como prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). Durante o quadro séptico as alterações microvasculares são particularmente complexas, e podem ser independentes da pressão arterial. A relação entre a hemodinâmica global e a microcirculação não é completamente conhecida sendo um dos mecanismos fisiopatológicos de mais interesse actualmente (33). As alterações na microcirculação envolvem não só alterações sistémicas como aumento do débito cardíaco e diminuição da resistência vascular sistémica, mas também, alterações na redistribuição regional do fluxo sanguíneo, desencadeadas por mediadores inflamatórios libertados pelas células musculares lisas vasculares. A produção de NO, através da conversão do substrato L-arginina em L-citrulina ocorre predominantemente

no local da infecção e é estimulada pela produção local de IL-1 $\beta$  e, em menor quantidade, pelo TNF- $\alpha$  (34). O NO é produzido por três enzimas diferentes; a óxido nítrico sintetase (NOS) neuronal, endotelial (eNOS), importantes na homeostasia neuronal e vascular, respectivamente, e a isoforma indutível do óxido nítrico (iNOS), não expressa em situações normais, mas que é sintetizada de novo em resposta à inflamação (30). No choque séptico, a maior expressão da iNOS ocorre não tanto a nível macrofágico, como era anteriormente aceite, mas antes a nível das células de diversos órgãos parenquimatosos (35), principalmente a nível pulmonar, do baço e rins, mas também no coração, intestinos (36) e fígado (37). A expressão da iNOS e consequente produção de NO, deve-se em grande parte à via de sinalização intracelular mediada pelas quinases das proteínas activadas por mitogénio (MAPK), especialmente pelas subfamílias p38 (36) (38) e quinases c-Jun-NH2-terminal (JNKs), envolvidas na activação da via de sinalização NF-kB (38).

Assim, uma hiperprodução de NO à custa da iNOS, pode culminar em vasodilatação excessiva - por activação da enzima guanil ciclase que aumenta a produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) - hiporreatividade aos agentes vasopressores, disfunção miocárdica e dano tecidual (39). Também segundo Hollenberg (40) a permeabilidade vascular na sépsis é dependente da indução da iNOS. No entanto, outros estudos parecem demonstrar que o NO produzido pela eNOS tem também um papel importante na vasodilatação induzida na sépsis. Através da utilização de um modelo de endotoxémia em ratos desencadeado por LPS, Connelly et al (41) demonstraram que o NO proveniente da eNOS facilita a expressão da iNOS, através da via de sinalização fosfatilinositol-3-quinase/Akt. Nesse mesmo estudo ficou demonstrado que os ratos sem o gene que codifica a eNOS apresentam menor expressão de iNOS e maior resistência ao choque séptico provocado pela endotoxémia, quando comparados com ratos com a expressão génica normal. Conclui-se assim que a eNOS apresenta características pro-inflamatórias em situações de endotoxémia, o que contraria as funções normalmente desenvolvidas por esta enzima, que em situações normais é responsável pela manutenção da homeostasia cardiovascular.

De acordo com Ho et al (39) a concentração plasmática de NO correlaciona-se com a severidade da sépsis, existindo no entanto uma grande variabilidade inter-individual nos níveis de NO o que pode limitar seu valor como marcador durante a terapia do choque séptico.

### **b) Produção de Prostaciclina I2**

Em condições fisiológicas, a prostaciclina resulta do metabolismo do ácido araquidónico pelas enzimas ciclooxigenase 1 (COX-1) e prostaciclina sintetase presentes no endotélio vascular. O seu efeito é mediado pelos receptores de prostaciclina associados à proteína G presentes nas VSMCs, que ao serem activados promovem o aumento da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), o qual vai relaxar estas células. Höcherl et al (42) demonstraram que a contribuição da prostaciclina no choque séptico também ocorre através do seu receptor cuja expressão se encontra aumentada em diversos tecidos, entre os quais nas VSMCs e no tecido cardíaco. No entanto, tal como acontece com a iNOS, que só é expressada em situações em que haja estímulos pró-inflamatórios, também a COX-2 não está presente no organismo em situações normais, mas é altamente expressada na sépsis, parecendo estar envolvida na fisiopatologia da vasodilatação (43).

De acordo com Rajapakse et al (44), tanto a expressão aumentada de iNOS como a de COX2 parecem resultar, em grande parte, da activação da via de sinalização do NF-kB. Com a inibição específica desta via (através da inibição da fosforilação e degradação da proteína inibitória IκB, que se encontra acoplada ao NF-kB no citoplasma celular e que impede a sua translocação para o núcleo e consequentemente a sua activação, conseguiu-se diminuir a expressão de iNOS e de COX2. Tal foi conseguido através do bloqueio das MAPK p38 e JNKs, o que sugere que estas duas MAPK desempenham um papel importante na cascata de activação do NF-kB; estes resultados corroboram os de Nelin et al (38) e mostram que esta via pode ser um importante do ponto de controlo da inflamação. O principal responsável por esta regulação é a Proteína Quinase 1 Ativada por Mitógeno (MKP-1), regulando consequentemente a expressão da iNOS e da COX-2 (45) (46). O através do aumento da expressão da MKP-1 pelos GC como a dexametasona permite assim regular em parte, a transcrição de genes pró-inflamatórios através da via NF-kB (47). No entanto existe também uma outra sub-família de MAPK - as cinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs) (48) - e ainda a proteína NIK (NF-kB inducible kinase), capazes de activar o NF-kB por vias alternativas (44).

### **c) Formação de Peroxinitrito**

Para além do NO, Cauwels et al (49), utilizando um modelo de indução rápida de choque séptico em ratos através do uso de factor de necrose tumoral (TNF),



verificaram que existe um papel relevante das espécies reactivas de oxigénio (ROS) na fase inflamatória precoce. Estes demonstraram a ocorrência de hipotensão refractária e disfunção cardíaca mediadas por canais de potássio activados por cálcio de baixa condutância (SkCa), independentes do NO, uma vez que estas surgem antes da iNOS e dos metabolitos do NO poderem ser mensuráveis na circulação sanguínea. Além disso a utilização de antagonistas específicos de ROS principalmente antagonistas do radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) melhoram a hipotensão e a disfunção cardíaca, o que favorece um papel de relevo a este metabolito entre as restantes ROS.

Para além do  $\cdot\text{OH}$  também o ião superóxido parece ter importância no desenvolvimento da hipotensão. A sua condensação com o NO resulta na formação de peroxinitrito nas fases precoces da endotoxémia induzida em ratos, estando associada a disfunção endotelial, à diminuição da contractilidade vascular e à disfunção multiorgânica (50) o que poderá estar relacionado com o forte poder oxidativo e nitrosativo, com a disfunção da cadeia respiratória, a disfunção das membranas celulares e pela activação das metaloproteinases da matriz extracelular, por parte do peroxinitrito (51). A diminuição da contractilidade vascular potenciada pelo peroxinitrito está relacionada com a hiperpolarização das membranas das VSMC pela activação dos KATP (52).

#### **d) Indolamina 2,3 dioxigenase (IDO)**

O aminoácido essencial triptofano, que apresenta importância central na respiração celular assim como na neurotransmissão e no sistema imune, é convertido no metabolito tóxico quineurina - com propriedades vasodilatadoras - pela enzima IDO, a qual não é expressada em condições normais, mas sim em resposta a estímulos pró-inflamatórios mediados por diversas citocinas, em especial pelo IFN- $\alpha$  (53). O aumento da expressão desta enzima é verificado principalmente ao nível das células endoteliais dos vasos de resistência (54).

O rácio quineurina / triptofano serve como quantificador da actividade da IDO e correlaciona-se quer com a severidade da sépsis (53) quer com a necessidade de aumentar a dosagem dos agentes inotrópicos positivos (54). Embora não esteja directamente relacionado com o choque séptico, o aumento da quineurina está relacionado com a diminuição da contagem absoluta de linfócitos T CD4+, T CD8+ e linfócitos T *natural killer*, o que revela que além de alterações hemodinâmicas a IDO

tem também repercussões a nível do sistema imune (53).

O bloqueio da IDO, quer por modificação genética quer pelo uso de antagonistas da IDO em ratos em choque séptico, está relacionado com um aumento significativo da sobrevivência (55).

#### **e) Activação canais de potássio dependentes de ATP (KATP)**

Em condições normais, a vasoconstrição resulta de um aumento da concentração do ião cálcio no interior das VSMCs. Este aumento deve-se à interacção sinérgica de dois mecanismos distintos: um deles ocorre por via de activação de receptores específicos existentes nas membranas celulares das VSMCs por agentes como a angiotensina II e a noradrenalina; o outro resulta da alteração do potencial da membrana celular, o que leva à abertura dos canais de cálcio dependentes da voltagem e assim a um influxo do ião e consequentemente à contracção muscular (56).

A activação dos canais KATP, presentes nas membranas plasmáticas das células do músculo liso vascular, apresenta elevada importância na hiporreatividade vascular característica do choque séptico. A abertura dos KATP leva a um efluxo celular de potássio e consequente hiperpolarização da membrana plasmática o que inactiva os canais de cálcio dependentes de voltagem e assim diminuindo a concentração citosólica de cálcio na célula, ocorrendo relaxamento celular e hiporreatividade vascular, o que tem como consequência a hipotensão arterial (31).

Um estudo realizado em ratos Wistar por Collin et al (57) concluiu que existe uma hiper-expressão dos KATP durante o choque séptico. A utilização de um inibidor selectivo dos KATP melhorou não só a pressão arterial média (PAM) mas também a responsividade vascular aos agentes vasopressores. Este estudo demonstrou ainda que a sobre-regulação dos KATP numa fase inicial de sépsis está, em parte, relacionada com o aumento da produção de NO. No entanto, através da utilização de um inibidor do NO, pôde verificar-se que com o decorrer do tempo a expressão dos KATP persiste apesar da diminuição do NO, o que sugere que outros mecanismos estejam envolvidos na sua activação. Por fim a expressão de NF- $\kappa$ B induzida pelo modelo de sépsis desencadeado por ligadura e punção cecal (CLP) diminui quando da inibição da iNOS, o que parece indicar uma relação entre NF- $\kappa$ B, NO e os KATP. Conclusões semelhantes são encontradas por Wu et al (58) no que respeita à activação dos KATP pela produção de NO e à hiporreatividade vascular daí

resultante. Segundo d'Emmanuele di Villa Bianca et al (59), a dexametasona exerce um papel inibitório nos KATP presumivelmente por via do receptor de glucocorticóide, tendo efeitos positivos na recuperação da disfunção cardiovascular presente no choque séptico.

#### **f) Défice de Vasopressina**

A vasopressina (AVP), um péptido sintetizado nos núcleos paraventriculares e supraópticos do hipotálamo e armazenada em grânulos na hipófise posterior, é libertada em situações de hipotensão arterial, hipovolémia e de aumento da osmolalidade plasmática e urinária. Só cerca de 10 a 20% da AVP armazenada pode ser prontamente libertada; como tal, após uma libertação inicial rápida, esta vai sendo continuada e lentamente libertada enquanto o estímulo for mantido, numa proporção bastante inferior à inicial (60).

Os seus principais efeitos ocorrem através da activação dos receptores de vasopressina 1 e 2 (V1A e V2). A estimulação dos receptores V1A nas células de músculo liso vascular é responsável pela vasoconstrição, sendo este o mecanismo possivelmente responsável pela sua recomendação no choque séptico. Além disso, a activação dos receptores V2 leva a uma diminuição da excreção renal de água graças à promoção da transcrição do gene de aquaporina 2 e subsequente inserção de canais de aquaporina 2 nas células principais dos ductos colectores (60).

O choque séptico está associado a uma resposta bifásica nos níveis de AVP. Pouco tempo após o início do choque, os níveis plasmáticos de AVP aumentam adequadamente de forma a prevenir a hipoperfusão. Porém, com o decorrer do tempo esses níveis diminuem sendo que no choque séptico bem estabelecido os níveis de AVP são baixos. Vários mecanismos foram propostos para explicar esta diminuição, entre os quais, a depleção das reservas hipofisárias por estimulação constante pelos barorreceptores, a deficiência autonómica, a inibição da libertação da AVP devido a elevados níveis de noradrenalina e ainda a elevada produção de NO pelo endotélio vascular a nível hipofisário (61).

Höcherl et al (62), utilizando o modelo de sépsis induzida por CLP, demonstraram existir a nível renal, uma diminuição na expressão dos receptores V2 e do gene da aquaporina-2 durante a evolução do quadro séptico. Este concluiu ainda, que estas alterações ocorrem principalmente devido à activação do NF- $\kappa$ B. Como tal, foi

estudado qual o efeito que teria a utilização de um inibidor do NF- $\kappa$ B, tendo-se verificado uma atenuação na diminuição da PAM e também uma melhoria na função renal. No entanto, segundo Rehberg et al (63) a expressão extra-renal (nomeadamente endotelial) do receptor V2 pode estar relacionada com efeitos negativos no choque séptico, nomeadamente o agravamento da vasodilatação e da trombose microvascular.

Para além dos receptores V2, também a expressão dos receptores V1A a nível das VSMCs é diminuída, *in vitro*, por supressão da transcrição génica pela quantidade aumentada de citocinas pro-inflamatórias (64). Esta inibição resulta da activação da via de sinalização do NF- $\kappa$ B, e o uso de dexametasona diminui quase por completo este mecanismo (65).

### Alterações da coagulação

As toxinas libertadas pelas bactérias Gram positivas e os LPS da parede celular das bactérias Gram negativas desempenham um papel fundamental na iniciação da cascata inflamatória. O aumento da produção de inúmeras citocinas pro-inflamatórias como a IL-16 e a IL-1 (citocinas fortemente indutoras de coagulação) conduzem à activação da cascata de coagulação, pelo aumento da expressão do factor tecidual (TF) pelos monócitos e macrófagos e não tanto pelas células endoteliais como seria de esperar (66). Por sua vez o TF activa uma serie de eventos resultando na conversão de protrombina em trombina, que por sua vez gera fibrina, a partir do fibrinogénio. Simultaneamente, há uma desregulação dos mecanismos fibrinolíticos devido a uma elevada quantidade do inibidor do activador do plasminogénio do tipo 1. Para além disso, ocorre também um aumento do consumo e uma diminuição da produção de diversas proteínas anticoagulantes a nível das células endoteliais, como a proteína C, anti-trombina e a proteína inibidora da via do factor tecidual, que para além de acção anticoagulante, desempenham também uma função anti-inflamatória (67). A depleção das moléculas endógenas com acção anticoagulantes sobre o endotélio vascular, plaquetas e leucócitos culmina geralmente num estado pró-coagulante e na formação de microtrombos. A perfusão tecidual fica afectada, ocorrendo uma oxigenação tecidual insuficiente, culminando em morte celular e disfunção orgânica (68). Este tipo de evolução catastrófica é geralmente associada a sépsis por bactérias Gram negativas, podendo no entanto estar presente em infecções por outros tipos de bactérias e microorganismos (66).

É já reconhecido que as plaquetas desempenham um papel fundamental no *interface* coagulação-inflamação principalmente por poderem funcionar como reservatório de mediadores pró-inflamatórios que podem ser libertados nos locais de lesão endotelial. (69).

Segundo Moraes et al (69) as plaquetas expressam GR mas que apresentam características diferentes em relação a outras células, podendo os GC afectar rapidamente a função plaquetária através de mecanismos não genómicos. Entre os efeitos observados encontra-se a diminuição da agregação plaquetária, efeito este que é constatado apenas com o uso de prednisolona e não com a utilização de outros GC como a hidrocortisona. Esta discrepância pode ser explicada pela existência de um composto nitroso derivado da prednisolona e pela inibição da formação de tromboxano-B2 que inibem a agregação plaquetária.

## Sistema imune na sépsis

As alterações imunológicas que se vão verificando ao longo da evolução do quadro séptico estão envoltas em grande controvérsia. Não existe consenso relativamente se o prognóstico sombrio da sépsis se deve exclusivamente a um estado pro-inflamatório desregulado, ou se o estado subsequente de recuperação imune que se caracteriza pelo desenvolvimento de imunossupressão, é ou não capaz de influenciar o desfecho da sépsis. Em indivíduos normais a resposta inflamatória local é contrabalançada pela libertação de diversos mediadores anti-inflamatória na circulação sanguínea que limitam a primeira. No entanto, quando ocorre uma activação demasiado intensa da resposta inflamatória sistémica normal - como se verifica por exemplo, após-traumas severos, durante sépsis, entre outros - esta activação inicial pode induzir um estado de imunoparalisia (70).

Muenzer et al (71) demonstram a existência de um estadio inflamatório precoce aquando do início do quadro séptico, que é marcado por um fenótipo hiper-inflamatório, posteriormente alterado para um fenótipo hipoinflamatório marcado com uma duração de pelo menos quatro dias, ocorrendo uma recuperação parcial do sistema imune cerca de sete dias após a indução de sépsis por CLP. Através da utilização deste mesmo modelo de sépsis, Xiao et al (72) apontam um estado hiperinflamatório inicial, que se caracteriza pela presença de elevadas quantidades de IL-6, que posteriormente irá diminuir acentuadamente devido a uma hipofunção macrófagica, apontando para uma disfunção imune tardia no quadro. Quer as elevadas quantidades de IL-6 produzidas na fase precoce quer a sua diminuição profunda nas fases mais tardias podem resultar num aumento da mortalidade (72) (73). No entanto é preciso ter em conta que esta relação pode apresentar uma elevada variabilidade individual.

Existem diversas alterações ao nível da imunidade inata e adaptativa aquando da transição de sépsis para sépsis severa/choque séptico, dependentes também do tipo de infecção subjacente. A activação monocitária com consequente produção de citocinas, as contagens absolutas assim como o índice de apoptose de Linfócitos T CD8+, CD4+ e Linfócitos B, apresentam divergências quando se compara o estado de sépsis com sépsis severa/choque. No entanto algumas das alterações parecem ser actualmente aceites a respeito do choque séptico, nomeadamente, a apoptose de linfócitos CD4, linfócitos B (74) (75) e a imunoparalisia dos monócitos caracterizada por uma diminuição da expressão de HLA-DR (76) (74). Pelo contrário, a apoptose dos

neutrófilos activados nos locais da inflamação encontra-se diminuída (77) (78), desempenhando estes um papel fundamental nas respostas inflamatórias presentes na sépsis, como por exemplo, no desenvolvimento ARDS, distante do local de infecção primária causadora de sépsis (79). O grau de apoptose dos neutrófilos no sangue periférico correlaciona-se inversamente com a gravidade da sépsis e da ARDS induzida por sépsis (80). A função monocitária de apresentação de antígenos às células Th1 é de elevada importância na resposta imune adaptativa. Uma diminuição da expressão monocitária de HLA-DR envolvido nessa interacção acarreta um aumento do risco de infecção. A diminuição da expressão de HLA-DR é verificada com a utilização de hidrocortisona em baixas doses (<300mg/dia), não sendo no entanto suficiente para causar uma resposta imune ineficaz (81) e como tal, não se encontra associado a um aumento do risco de infecções secundárias (82) (83).

Através da realização de um estudo utilizando um modelo de sépsis induzido por CLP em ratos - Kelly-Scumpia et al (84) demonstraram que os linfócitos B, para além da função de produção de anticorpos, desempenham também uma acção importante nas fases iniciais da resposta imune inata do hospedeiro à infecção bacteriana. Nos ratos com ausência de linfócitos B, a produção de citocinas inflamatórias durante a resposta imune inata fica bastante diminuída. Para além disso, esses ratos apresentam também menores níveis de citocinas dependentes do Interferão tipo I (IFN-I). A via de sinalização IFN-I, uma citocina pleiotrópica independente da via do TLR, regula a activação das células responsáveis quer pela imunidade inata quer pela adaptativa, durante a sépsis. Essa via de sinalização é importante não só na activação dos linfócitos B e T, como também, na estimulação da produção de citocinas por parte dos linfócitos B, importantes na depuração bacteriana. Esta nova descoberta é apoiada por Rauch et al (85), que atribuíram esta função a uma subpopulação de linfócitos B que se desenvolve a partir de linfócitos B1 encontrados principalmente nas cavidades peritoneal, pleural e em menor quantidade no baço. Este tipo de linfócitos B, denominados activadores da resposta inata, estimula também a proliferação e a maturação dos leucócitos através da produção de GM-CSF.

Alterações nos linfócitos T também parecem contribuir para as alterações imunes tardias que se verificam na sépsis. Hiraki et al (86) demonstraram através de um modelo de sépsis induzido em ratos por CLP, haver um aumento de um subgrupo de linfócitos T nos doentes com sépsis, Linfócitos Reguladores (CD4+ e CD25+), que expressam a Proteína Forkhead Fox 3 (Foxp3), com função de manter a homeostasia e a tolerância imune. O aumento deste subgrupo, em relação ao número de linfócitos

T CD4+ parece relacionar-se com o aumento das citocinas imunorreguladoras como a IL-10 e o factor de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ). Por sua vez, o aumento dessas citocinas parece levar a uma diminuição e hipofunção dos linfócitos Th1 presentes nos estadios mais tardios do quadro séptico. Tal conclusão é corroborada aquando da utilização de neutralizadores da IL-10 e TGF-  $\beta$ , os quais vão permitir uma recuperação da contagem de linfócitos Th1 e uma diminuição dos linfócitos T reguladores. Verifica-se também que a utilização de estes neutralizadores se associou a uma maior sobrevida dos ratos em estudo.

A IL-10 é produzida por uma grande variedade de células que vão desde os macrófagos/neutrófilos (87) até aos linfócitos B1 (88) e linfócitos T (86), desempenhando um papel central na regulação da resposta imune inata e adaptativa. Segundo Muenzer et al (71) o bloqueio desta citocina pode ser favorável à restituição das funções do sistema imune e consequentemente a um aumento da sobrevida dos doentes sépticos atingidos por infeções secundárias, responsáveis em parte pela elevada mortalidade associada a este síndrome. Os GC regulam a inflamação pela diminuição da expressão de citocinas inflamatórias como a IL-6, IL-8 (81), IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , linfotóxina  $\beta$  e potenciam uma acção anti-inflamatória pelo aumento da expressão de IL-10, receptor da IL-10 e TGF-  $\beta$  (89). Hotchkiss et al (90) confirmam a existência de um elevado índice de apoptose dos linfócitos em circulação, nomeadamente de linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos B e células *natural killer* (NK). Segundo os mesmos autores, este índice apoptótico não apresenta diferenças significativas quando comparado entre doentes sépticos em choque com doentes sépticos sem choque.

O processo de apoptose celular verificado no quadro séptico parece ser aumentado pela utilização de altas doses de GC. Em particular, a apoptose de monócitos e linfócitos poderá estar associada a um aumento do risco de imunossupressão e consequentemente do risco de infeções secundárias. O aumento da eficácia na fagocitose de células apoptóticas por parte dos macrófagos, graças à activação de genes pró-apoptóticos, pode explicar esse efeito (91).



### Efeitos dos corticoesteróides no sistema cardiovascular

A utilização de baixas doses de hidrocortisona em doentes em choque séptico com início recente (isto é, <24 horas) está associado a uma reversão mais rápida do choque (82) (92). Park et al (92), para além de corroborarem esta evidência, demonstraram ainda que a hidrocortisona instituída numa fase precoce do choque séptico está associada de forma independente a uma menor taxa de mortalidade aos 28 dias. Adicionalmente, demonstrou que a instituição da terapêutica em menos de seis horas após o início do choque séptico está associado a uma diminuição de 37% do risco relativo de mortalidade aos 28 dias quando comparada com a mesma terapêutica instituída mais de seis horas após o início do quadro. Esta diminuição da mortalidade parece ocorrer apenas com uma duração da terapêutica superior a cinco dias (83).

A utilização de baixas doses de hidrocortisona parece induzir alterações hemodinâmicas significativas na circulação sistémica. O aumento da pressão arterial média acompanhado por uma redução significativa da necessidade de noradrenalina, um aumento da RVS, assim como diminuição do índice cardíaco e na frequência cardíaca sugere efeitos predominantes no tónus vascular dos vasos de resistência (81). Conclusões semelhantes relativamente ao aumento do RVS e da PAM são descritas por Aboab et al (93).

A diminuição da indução da iNOS, pode ser conseguida pelo uso de baixas doses de dexametasona. Através deste mecanismo, para além de se aumentar a PAM e o fluxo sanguíneo renal, previne-se também o aparecimento de áreas de hipoxémia cortical, e aumenta-se o aporte e melhora-se o consumo de oxigénio a nível renal (94).

Entre os inúmeros tipos de citocinas pró-inflamatórias durante o choque séptico, as que são derivadas do NF- $\kappa$ B para além de regularem negativamente a expressão dos receptores V1A já descrita anteriormente, também parecem regular negativamente a expressão dos receptores de angiotensina II do tipo I (receptores AT1). Estes mecanismos não permitem uma resposta eficaz dos agentes vasopressores endógenos à vasodilatação induzida pela quantidade aumentada de NO, contribuindo assim para o quadro de resistência aos vasopressores que se pode verificar nestas situações. Porém, tal regulação não parece ser mediada por apenas uma citocina específica mas antes várias, o que pode explicar o insucesso de terapêuticas dirigidas a citocinas específicas. Assim, dado que o uso de GC inibe o factor de transcrição NF- $\kappa$ B, parecem ter um papel importante na resolução do quadro de choque hemodinâmico, verificando-se um aumento da PAM e da RVS com o seu uso (95).

Estes mesmos autores demonstraram a existência de uma diminuição na expressão dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos nas células do músculo liso vascular ao longo da evolução do quadro séptico, estando também este fenómeno relacionado também com o NF-kB. Através do bloqueio da via de sinalização do NF-kB, verificou-se que houve uma melhoria significativa dos parâmetros hemodinâmicos (PAM e RVS) nos ratos em estudo (96). Tal leva-nos a concluir que o NF-kB tem um papel central na fisiopatologia da disfunção cardiovascular séptica. Paralelamente verificou-se ainda que o uso de dexametasona resultou numa diminuição menor dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos, o que resulta da diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Estes resultados confirmam os obtidos por Sakue e Hoffman (97), segundo os quais o uso de dexametasona aumenta a sensibilidade das células do músculo liso vascular às catecolaminas por aumentar a expressão dos receptor  $\alpha$ 1-adrenérgicos.

## Conclusão

Múltiplos mecanismos são hoje reconhecidos como parte integrante da fisiopatologia do choque séptico, entre os quais a activação dos canais de potássio dependentes de ATP nas membranas plasmáticas das VSMCs, o défice de hormona vasopressina e uma produção aumentada de várias substâncias vasodilatadoras como o óxido nítrico, prostaciclina, quineurina e peroxinitrito.

A actividade dos GC quer a nível da resposta inflamatória quer a nível hemodinâmico é difícil de individualizar, devendo ser vista de uma forma integrada. Existem múltiplos mecanismos que parecem justificar a utilização dos mesmos no choque refractário, existindo certamente ainda alguns mecanismos por desvendar.

O efeito dos GC passa principalmente pela inibição da via de sinalização do NF- $\kappa$ B, inibindo assim as enzimas iNOS e COX-2 e consequentemente a produção de óxido nítrico e prostaciclina  $I_2$ , respectivamente. A inibição do NF- $\kappa$ B aumenta ainda a expressão dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos, dos receptores V1A de vasopressina, e da angiotensina tipo II, potenciando os efeitos dos agentes vasopressores através de um aumento da reactividade vascular. Embora todos estes efeitos dos GC sejam benéficos, a taxa de mortalidade no choque séptico continua a ser bastante elevada. Apesar dos GC inibirem o NF- $\kappa$ B, que desempenha um papel central no desenvolvimento de choque séptico, podem existir uma multiplicidade de vias alternativas passíveis de activarem esse factor e nas quais os GC podem não exercer efeito.

De acordo com a evidência actual, a instituição de GC numa fase precoce do choque séptico demonstra diminuir a taxa de mortalidade, no entanto apesar de todas as terapêuticas recomendadas actualmente na abordagem inicial ao doente em choque séptico, o uso de GC não é uma recomendação de primeira linha. Parecem ainda não existir recomendações específicas relativamente ao intervalo de tempo óptimo para a sua utilização, ficando essa decisão geralmente sujeita à experiência clínica por parte dos profissionais que acompanham cada caso individualmente.

São necessários mais estudos tendo em vista o aprofundamento do conhecimento sobre os múltiplos efeitos dos GC no choque séptico, podendo ser útil no futuro estudar a sua relação com a enzima IDO e com os KATP, assim como estudar a expressão do GR em diversos tecidos no quadro séptico.

## Referências bibliográficas

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*. 2001;29:1303-1310.
2. Cardoso T, Carneiro AH, Ribeiro O, Teixeira-Pinto A, Costa-Pereira A. Reducing mortality in severe sepsis with the implementation of a core 6-hour bundle: results from the Portuguese community-acquired sepsis study (SACiUCI study). *Critical Care*. 2010;14R:83
3. Japiassú AM, Salluh JI, Bozza PT, Bozza FA, Castro-Faria-Neto HC. Revisiting steroid treatment for septic shock: molecular actions and clinical effects: A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104:531-548.
4. Molina PE. Neurobiology of stress response: contribution of sympathetic nervous system to the neuroimmune axis in trauma injury. *Shock*. 2005;24:3-10.
5. Groeneweg FL, Karst H, Ron de Kloet E, Joëls M. Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the centra stress response. *Journal of Endocrinology*. 2011;209:153-167.
6. Marik PE. Critical Illness-Related Corticosteroid Insufficiency. *Chest*. 2009; 135:181-193.
7. Briegel J, Sprung CL, Annane D, Singer M, Keh D, Moreno R, et al. Multicenter comparison of cortisol as measured by different methods in samples of patients with septic shock. *Intensive Care Medicine*. 2009; 35:2151-2156.
8. Seam N, Suffredini AF. Mechanisms of sepsis and insights from clinical trials. *Drug Discovery Today Disease Mechanisms*. 2007;4:83-93.
9. Annane D, Bellissant E, Cavaillon J. Septic Shock. *Lancet*. 2005; 365:63-78.
10. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochemical Journal*. 2009; 420:1-16.
11. Ding J, Song D, Ye X, Liu SF. A Pivotal Role of Endothelial-specific NF- $\kappa$ B Signaling in the Pathogenesis of Septic Shock and Septic Vascular Dysfunction. *Journal of Immunology*. 2009; 183:4031-4038.
12. Hamidi A, von Bulow V, Hamidi R, Winssinger N, Barluenga S, Heldin CH, et al. Polyubiquitination of transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )-associated kinase 1 mediates nuclear factor- $\kappa$ B activation in response to different inflammatory stimuli. *Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287:123-133.

13. Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *New England Journal of Medicine*. 2003; 348:138-150.
14. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Keh D, Kupfer Y. Corticosteroids for severe sepsis and septic shock: a systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2004; 329:480.
15. Moran J, Graham P, Rockliff S, Bersten A. Updating the evidence for the role of corticosteroids in severe sepsis and septic shock: a Bayesian meta-analytic perspective. *Critical Care*. 2010; 14:R134.
16. Foteinou PT, Calvano SE, Lowry SF, Androulakis LP. In Silico Simulation of Corticosteroids Effect on an NFkB-Dependent Physicochemical Model of Systemic Inflammation. *PloS ONE*. 2009; 4:e4706.
17. Minneci PC, Deans KJ, Eichacker PQ, Natanson C. The effects of steroids during sepsis depend on dose and severity of illness: an updated meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009; 15:308-318.
18. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Medicine*. 2008; 34:17-60.
19. Ito K, Chung F, Adcock I. Update on glucocorticoid action and resistance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006; 117:522-543.
20. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids - New Mechanisms for Old Drugs. *New England Journal of Medicine*. 2005; 353:1711-1723.
21. Alangari AA. Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma. *Annals of Thoracic Medicine*. 2010; 5:133-139.
22. Cao L, Li-Ling Q, You-Rong Z, Chun-Bao G, Xiao-Hui G, Bo S. Regulation of activity of nuclear factor-kB and activator protein-1 by nitric oxide, surfactant and glucocorticoids in alveolar macrophages from piglets with acute lung injury. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2003; 24:1316-1323.
23. Lösel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, et al. Nongenomic Steroid Action: Controversies, Questions, and Answers. *Physiological Reviews*. 2003; 83:965-1016.
24. Meduri GU, Muthiah MP, Carratu P, Eltorky M, Chrousos GP. Nuclear factor-kB- and glucocorticoid receptor  $\alpha$ - mediated mechanisms in the regulation of systemic and pulmonary inflammation during sepsis and acute respiratory distress syndrome: Evidence for inflammation-induced target tissue resistance to glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*. 2005; 12:321-38.

25. Buttgereit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids*. 2002; 67:529-534.
26. Stahn C, Löwenberg M, Hommes DW, Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2007; 275:71-78.
27. Löwenberg M, Tuynman J, Bilderbeek J, Gaber T, Buttgereit F, van Deventer S, et al. Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood*. 2005; 106:1703-1710.
28. Cai B, Deitch EA, Ulloa L. Novel Insights for Systemic Inflammation in Sepsis and Hemorrhage. *Mediators of Inflammation*. 2010; 2010.
29. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van de Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008; 83:536-545.
30. Cauwels A. Nitric oxide in shock. *Kidney International*. 2007; 72:557-565.
31. Landry DW, Oliver JA. The Pathogenesis of Vasodilatory Shock. *New England Journal of Medicine*. 2001; 345:588-595
32. Jeanneret S, Sanchez B, Liaudet L. Physiopathologie et traitement de la vasoplégie au cours du sepsis. *Revue Médicale Suisse*. 2011; 7:2435-2438.
33. Trzeciak S, Dellinger RP, Parrillo JE, Guglielmi M, Bajaj J, Abate NL, et al. Early Microcirculatory Perfusion Derangements in Patients With Severe Sepsis and Septic Shock: Relationship to Hemodynamics. *Annals of Emergency Medicine*. 2007; 49: 88-98.
34. Annane D, Sanquer S, Sébille V, Faye A, Djuranovic D, Raphaël JC, et al. Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. *The Lancet*. 2000; 355:1143-48.
35. Bultinck J, Sips P, Vakaet L, Brouckaert P, Cauwels A. Systemic NO production during (septic) shock depends on parenchymal and not on hematopoietic cells: in vivo iNOS expression pattern in (septic) shock. *FASEB journal*. 2006; 20:2363-2365.
36. Kan W, Zhao K, Jiang Y, Yan W, Huang Q, Wang J, et al. Lung, spleen, and kidney are the major places for inducible nitric oxide synthase expression in endotoxic shock: Role of p38 mitogen-activated protein kinase in signal transduction of inducible nitric oxide synthase expression. *Shock*. 2004; 21:281-287.
37. Eyenga P, Lhuillier F, Morel J, Roussel D, Sibille B, Letexier D, et al. Time course of liver nitric oxide concentration in early septic shock by cecal ligation and puncture in rats. *Nitric Oxide*. 2010; 23:194-198.

38. Nelin L, Wang X, Zhao Q, Chicoine LG, Young TL, Hatch DM, et al. MKP-1 switches arginine metabolism from nitric oxide synthase to arginase following endotoxin challenge. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2007; 293:632-640.
39. Ho JT, Chapman MJ, O'Connor S, Lam S, Edwards J, Ludbrook G, et al. Characteristics of plasma NOx levels in severe sepsis: high interindividual variability and correlation with illness severity, but lack of correlation with cortisol levels. *Clinical Endocrinology*. 2010; 73:413-420.
40. Hollenberg S, Guglielmi M, Parrillo JE. Discordance between microvascular permeability and leukocyte dynamics in septic inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Critical Care*. 2007; 11:R125.
41. Connelly L, Madhani M, Hobbs AJ. Resistance to Endotoxic Shock in Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) Knock-out Mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280:10040-10046.
42. Höcherl K, Schmidt C, Kurt B, Bucher M. Activation of the PGI<sub>2</sub>/IP System Contributes to the Development of Circulatory Failure in a Rat Model of Endotoxic Shock. *Hypertension*. 2008; 52:330-335.
43. Schildknecht S, Bachschmid M, Baumann A, Ullrich V. COX-2 inhibitors selectively block prostacyclin synthesis in endotoxin-exposed vascular smooth muscle cells. *FASEB Journal*. 2004; 18: 757-759.
44. Rajapakse N, Kim M, Mendis E, Kim SK. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells by carboxybutyrylated glucosamine takes place via down-regulation of mitogen-activated protein kinase-mediated nuclear factor- $\kappa$ B signaling. *Immunology*. 2008; 123:348-357.
45. Calvert T, Chicoine L, Liu Y, Nelin L. Deficiency of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 results in iNOS-mediated hypotension in response to low-dose endotoxin. *American Journal Physiology- Heart and Circulatory Physiology*. 2008; 294: 1621-1629.
46. Wang X, Zhao Q, Matta R, Meng X, Liu X, Liu C, et al. Inducible Nitric-oxide Synthase Expression Is Regulated by Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284:27123-27134.
47. King E, Holden N, Gong W, Rider C, Newton R. Inhibition of NF- $\kappa$ B-dependent Transcription by MKP-1: Transcriptional repression by glucocorticoids occurring via p38-MAP. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284:26803-26815.

48. Korkmaz B, Buharalioglu K, Sahan-Firat S, Cuez T, Demiryurek T, Tunctan B. Activation of MEK1/ERK1/2/iNOS/sGC/PKG pathway associated with peroxynitrite formation contributes to hypotension and vascular hyporeactivity in endotoxemic rats. *Nitric Oxide*. 2011; 24:160-172.
49. Cauwels A, Rogge E, Janssen B, Brouckaert P. Reactive oxygen species and small-conductance calcium-dependent potassium channels are key mediators of inflammation-induced hypotension and shock. *Journal Molecular Medicine*. 2010; 88: 921-930.
50. Cuzzocrea S, Mazzone E, Di Paola R, Esposito E, Macarthur H, Matuschak GM, et al. A Role for Nitric Oxide-Mediated Peroxynitrite Formation in a Model of Endotoxin-Induced Shock. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006; 319:73-81.
51. Maybauer DM, Maybauer MO, Szabó C, Cox RA, Westphal M, Kiss L, et al. The Peroxynitrite Catalyst WW-85 Improves Pulmonary Function in Ovine Septic Shock. *Shock*. 2011; 35:148-155.
52. Zhao KS, Yang GY, Jin C, Huang Q, Huang X. Peroxynitrite leads to arteriolar smooth muscle cell membrane hyperpolarization and low vasoreactivity in severe shock. *Clinical Hemorheology and microcirculation*. 2000; 23:259-267.
53. Darcy CJ, Davis JS, Woodberry T, McNeil YR, Stephens DP, Yeo TW, et al. An Observational Cohort Study of the Kynurenine to Tryptophan Ratio in Sepsis: Association with Impaired Immune and Microvascular Function. *Plos One*. 2011; 6:e21185
54. Changsirivathanathamrong D, Wang Y, Rajbhandari D, Maghazal GJ, Mak WM, Woolfe C, et al. Tryptophan metabolism to kynurenine is a potential novel contributor to hypotension in human sepsis. *Critical Care Medicine*. 2011; 39:2678-2683.
55. Jung ID, Lee M, Chang JH, Lee JS, Jeong Y, Lee C, et al. Blockade of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Protects Mice against Lipopolysaccharide-Induced Endotoxin Shock. *Journal of Immunology*. 2009; 182:3146-3154.
56. Levy B, Collin S, Sennoun N, Ducrocq N, Kimmoun A, Asfar P, et al. Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. *Intensive Care Medicine*. 2010; 36:2019-2029.
57. Collin S, Sennoun N, Dron A, de la Bourdonnaye M, Montemont C, Asfar P, et al. Vascular ATP-sensitive potassium channels are over-expressed and partially regulated by nitric oxide in experimental septic shock. *Intensive Care Medicine*. 2011; 37:861-869.
58. Wu CC, Chen SJ, Garland CJ. NO and KATP channels underlie endotoxin-induced smooth muscle hyperpolarization in rat mesenteric resistance arteries. *British Journal of Pharmacology*. 2004; 142:479-484.



59. d’Emmanuele di Villa Bianca R, Lippolis L, Autore G, Popolo A, Marzocco S, Sorrentino L, et al. Dexamethasone improves vascular hyporeactivity induced by LPS in vivo by modulating ATP-sensitive potassium channels activity. *British Journal of Pharmacology*. 2003; 140:91-96.
60. Kampmeier TG, Rehberg S, Westphal M, Lange M. Vasopressin in sepsis and septic shock. *Minerva Anestesiologica*. 2010; 76:844-850.
61. Holmes CL, Patel BM, Russell JA, Walley KR. Physiology of Vasopressin Relevant to Management of Septic Shock. *Chest*. 2001; 120:989-1002.
62. Höcherl K, Schmidt C, Kurt B, Bucher M. Inhibition of NF- $\kappa$ B ameliorates sepsis-induced downregulation of aquaporin-2/V2 receptor expression and acute renal failure in vivo. *American Journal Physiology Renal Physiology*. 2010; 298:196-204.
63. Rehberg S, Ertmer C, Lange M, Morelli A, Whorton E, Dünser M, et al. Role of selective V2-receptor-antagonism in septic shock: a randomized, controlled, experimental study. *Critical Care*. 2010; 14R:200.
64. Bucher M, Hobbhahn J, Taeger K, Kurtz A. Cytokine-mediated downregulation of vasopressin V1A receptors during acute endotoxemia in rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2002; 282:979-984.
65. Schmidt C, Höcherl K, Kurt B, Bucher M. Role of nuclear factor- $\kappa$ B-dependent induction of cytokines in the regulation of vasopressin V1A-receptors during cecal ligation and puncture-induced circulatory failure. *Critical Care Medicine*. 2008; 36:2363-2372.
66. Semeraro N, Ammollo C, Semeraro F, Colucci M. Sepsis, thrombosis and organ dysfunction. *Thrombosis Research*. 2012; 129:290-295.
67. Silva E, Passos RdH, Ferri MB, de Figueiredo LF. Sepsis: from bench to bedside. *Clinics*. 2008; 63:109-120.
68. Kotsovolis G, Kallaras K. The role of endothelium and endogenous vasoactive substances in sepsis. *Hippokratia*. 2010; 14:88-93.
69. Moraes LA, Paul-Clark MJ, Rickman A, Flower RJ, Goulding NJ, Perretti M. Ligand-specific glucocorticoid receptor activation in human platelets. *Blood*. 2005; 106:4167-4175.
70. Munford RS, Pugin J. Normal Responses to Injury Prevent Systemic Inflammation and Can Be Immunosuppressive. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001; 163(2):316-321.

71. Muenzer J, Davis CG, Chang K, Schmidt RE, Dunne WM, Coopersmith CM, et al. Characterization and Modulation of the Immunosuppressive Phase of Sepsis. *Infection and Immunity*. 2010; 78:1582-1592.
72. Xiao H, Siddiqui J, Remick DG. Mechanisms of Mortality in Early and Late Sepsis. *Infection and Immunity*. 2006; 74:5227-5235.
73. Annane D, Sébille V, Bellissant E. Effect of low doses of corticosteroids in septic shock patients with or without early acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Medicine*. 2006; 34:22-30.
74. Gogos C, Kotsaki A, Pelekanou A, Giannikopoulos G, Vaki I, Maravitsa P, et al. Early alterations of the innate and adaptive immune statuses in sepsis according to the type of underlying infection. *Critical Care*. 2010; 14R:96.
75. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, et al. Early circulation lymphocyte apoptosis in Human septic shock is associated with poor outcome. *Shock*. 2002; 18:487-494.
76. Wu H, Shih C, Lin C, Hua C, Chuang D. Serial increase of IL-12 response and human leukocyte antigen-DR expression in severe sepsis survivors. *Critical Care*. 2011; 15R:224.
77. Jimenez WF, Watson RW, Parodo J, Evans D, Foster D, Steinberg M, et al. Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. *Archives of Surgery*. 1997; 132:1263-1269.
78. Tamayo E, Gómez E, Bustamante J, Gómez-Herreras J, Fonteriz R, Bobillo F, et al. Evolution of neutrophil apoptosis in septic shock survivors and nonsurvivors. *Journal of Critical Care*. 2011.
79. Chopra M, Reuben JS, Sharma AC. Acute Lung Injury: Apoptosis and Signaling Mechanisms. *Experimental Biology and Medicine*. 2009; 234:361-371.
80. Fialkow L, Fochesatto Filho L, Bozzetti MC, Milani AR, Rodrigues Filho EM, Ladniuk RM, et al. Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Critical Care*. 2006;10:R155.
81. Keh D, Boehnke T, Weber-Cartens S, Schulz C, Ahlers O, Bercker S, et al. Immunologic and Hemodynamic Effects of “Low-Dose” Hydrocortisone in Septic Shock. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003; 167:512-520.
82. Oppert M, Schindler R, Husung C, Offermann K, Gräf K, Boenisch O, et al. Low-dose hydrocortisone improves shock reversal and reduces cytokine levels in early hyperdynamic septic shock. *Critical Care Medicine*. 2005; 33:2457-2464.

83. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Confalonieri M, De Gaudio R, et al. Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *Journal of American Medical Association*. 2009; 301:2362-2375.
84. Kelly-Scumpia K, Scumpia PO, Weinstein J, Delano M, Cuenca AG, Nacionales DC, et al. B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2011; 208:1673-1682.
85. Rauch PJ, Chudnovskiy A, Robbins CS, Weber GF, Etzrodt M, Hilgendorf I, et al. Innate Response Activator B Cells Protect Against Microbial Sepsis. *Science*. 2012; 335:597-601.
86. Hiraki S, Ono S, Tsujimoto H, Kinoshita M, Takahata R, Miyazaki H, et al. Neutralization of interleukin-10 or transforming growth factor- $\beta$  decreases the percentages of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in septic mice, thereby leading to an improved survival. *SURGERY*. 2012; 151:313-322.
87. Siewe L, Bollati-Fogolin M, Wickenhauser C, Krieg T, Müller W, Roers A. Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. *European Journal of Immunology*. 2006; 36:3248-3255.
88. Barbeiro DF, Barbeiro HV, Faintuch J, Ariga SK, Mariano M, Popi AF, et al. B-1 cells temper endotoxemic inflammatory responses. *Immunobiology*. 2011; 216:302-308.
89. Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, et al. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB Journal*. 2002; 16:61-71.
90. Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Coopersmith CM, Karl IE. Accelerated Lymphocyte Death in Sepsis Occurs by both the Death Receptor and Mitochondrial Pathways. *Journal of Immunology*. 2005; 174:5110-5118.
91. Kamiyama K, Matsuda N, Yamamoto S, Takano K, Takano Y, Yamazaki H, et al. Modulation of glucocorticoid receptor expression, inflammation, and cell apoptosis in septic guinea pig lungs using methylprednisolone. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008; 295:998-1006.
92. Park HY, Suh GY, Song J, Yoo H, Jo IJ, Shin TG, et al. Early initiation of low-dose corticosteroid therapy in the management of septic shock: a retrospective observational study. *Critical Care*. 2012;16:R3.
93. Aboab J, Polito A, Orlikowski D, Sharshar T, Castel M, Annane D. Hydrocortisone effects on cardiovascular variability in septic shock: A spectral analysis approach. *Critical Care Medicine*. 2008; 36:1481-1486.

94. Johannes T, Mik EG, Klingel K, Dieterich H, Unertl KE, Ince C. Low-dose dexamethasone-supplemented fluid resuscitation reverses endotoxin-induced acute renal failure and prevents cortical microvascular hypoxia. *Shock*. 2009; 31:521-528.
95. Schmidt C, Höcherl K, Kurt B, Moritz S, Kurtz A, Bucher M. Blockade of multiple but not single cytokines abrogates downregulation of angiotensin II type-I receptors and anticipates septic shock. *Cytokine*. 2010; 49:30-38.
96. Schmidt C, Kurt B, Höcherl K, Bucher M. Inhibition of Nf-kB Activity Prevents Downregulation Of  $\alpha$ 1-Adrenergic Receptors and Circulatory Failure During CLP-Induced Sepsis. *Shock*. 2009; 32:239-246.
97. Sakaue M, Hoffman BB. Glucocorticoids Induce Transcription and Expression of the  $\alpha$ 1B Adrenergic Receptor Gene in DTT1 MF-2 Smooth Muscle Cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1991; 88:385-389.